

马铃薯光响应 *StR2R3-MYB1* 基因的克隆与表达分析

秦玉芝¹, 邢铮¹, 潘妃¹, 熊兴耀^{1,2*}

(1. 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 以马铃薯原始栽培种 Yan (*S. tuberosum* subsp. *andigena* var. *yanacochense*) 为材料, 采用同源克隆技术, 得到 1 条 800 bp 的 cDNA 片段。该 cDNA 片段包含 1 个完整的开放阅读框, 编码 265 个氨基酸长度的蛋白质, 定位在马铃薯 10 号染色体上。在线氨基酸序列分析、原生质体转化核定位分析和定量 PCR 表达特异性分析结果表明, 该蛋白与番茄 SICMYB1、茄子 SmMYB 的同源性达 99%, 与拟南芥 AtMYB113 的同源性在 70% 以上; 该蛋白含有 2 个 DNA-结合结构域, 是 2 个串联的 myb-功能域, 属于 R2R3 类 MYB 转录因子, 命名为 *StR2R3-MYB1*。*StR2R3-MYB1* 基因的调控区域存在 G-Box、Box4、Box II、I-Box、MNF1 等光相关元件和脱落酸诱导相关元件 ABRE、生物钟相关元件 Circadian、茉莉酸甲酯相关元件 CGTCA。*StR2R3-MYB1* 氨基酸序列没有跨膜信号, 不存在卷曲螺旋, 其 N 端存在蛋白信号肽, 具有明显的亲水区域; *StR2R3-MYB1* 基因在细胞核内表达; *StR2R3-MYB1* 在根、茎、叶中的表达量依次升高, 同时受白光、远红光和蓝光的诱导表达。综合分析结果表明, 马铃薯 *StR2R3-MYB1* 基因是 1 个光响应 MYB 类转录因子。

关键词: 马铃薯; MYB 转录因子; 光响应相关基因

中图分类号: Q943.2; S532 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2015)04-0378-07

Cloning and expression analysis of *StR2R3-MYB1*, a light-inducible gene in potato

Qin Yuzhi¹, Xing Zhen¹, Pan Fei¹, Xiong Xingyao^{1,2*}

(1. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: A light-inducible gene was cloned and named by *StR2R3-MYB1*, which had a full length of 798 bp ORF, encoded a R2R3-MYB transcriptional factor with 265 amino acids, and located in number 10 chromosome of potato. It was showed from the amino acid sequence analysis that *StR2R3-MYB1* contained two DNA-binding domains which were composed of two tandem myb motifs. There were a large number of light associated components such as G-Box, Box4, Box II, I-Box, MNF1, ABRE (components induced by abscisic acid), Circadian (components related to biological clock) and CGTCA (components related to methyl jasmonate). It was not founded the transmembrane signal and the coiled coil in amino acid sequence of *StR2R3-MYB1*, while, it had an obvious hydrophilic region and protein signal on N terminal. R2R3-MYB-YFP, the fusion protein was localized at cell nucleus. *StR2R3-MYB1* was homologous with proteins R2R3-MYB in tomato (SICMYB1) and eggplant (SmMYB) with the similarity to 99% and more than 70% homology with *Arabidopsis thaliana* (AtMYB113). Tissue specific analysis indicated that *StR2R3-MYB1* expressed in root, stem and leaf. Semi-quantitative and real-time RT-PCR revealed that the *StR2R3-MYB1* expression was induced by white, far red and blue light.

Keywords: potato; MYB transcriptional factor; light-inducible gene

植物 MYB 类转录因子以含有 MYB 结构域为共同特征^[1]。每个 MYB 结构域以螺旋-转角-螺旋 (helix-turn-helix, HTH) 的形式结合于目标 DNA 大沟处, 调控目的基因的转录^[2]。第 1 个植物 myb 基因 *ZmMYBc1* 是 Paz-Ares 于 1987 年在玉米中发现的, *ZmMYBc1* 与动物 *myb* 基因的同源性达 40%^[3]。不同作物中 *myb* 基因的数量各异, 在玉米中表达的 *myb* 基因约有 80 个以上^[4], 拟南芥中 MYB 类转录因子有 129 个^[5], 马铃薯中 MYB 类转录因子有 117 个。MYB 类转录因子中以 R2R3-MYB 的数量最多, 其功能涉及植物次生代谢调控、细胞形态发生、激素刺激和环境胁迫应答、分生组织形成及细胞周期控制等过程^[6]。关于马铃薯 MYB 类基因克隆和功能分析的报道尚少。在前期研究中, 笔者发现了 1 个受光影响, 并且对马铃薯花青素合成关键酶 *StCHS* 基因表达具有明显正向作用的 MYB 转录因子 (GenBank: DQ917781.1)^[7], 本研究中通过同源克隆, 在马铃薯原始栽培种 Yan 中获得了该转录因子 (*StR2R3-MYB1*) 的完整 CDS 序列, 并运用现代生物信息学技术对马铃薯 *StR2R3-MYB1* 基因序列和蛋

白质序列特征进行了比对、分析和预测, 对基因表达的亚细胞定位、组织表达特异性及光照应答模式进行了分析, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

马铃薯原始栽培种 Yan (*S. tuberosum* subsp. *andigena* var. *yanacochense*) 由湖南农业大学马铃薯工程技术中心种质资源库提供。拟南芥原生质体由湖南大学生命科学与技术研究院刘选明先生惠赠。表达载体 pEGAD、pEGAD-MYC、PA7-YFP、大肠杆菌 DH5 α 、农杆菌菌株 Agl-0 均由湖南大学生命科学与技术研究院刘选明先生惠赠; T 载体 pGM-T 购自天根生化公司。

1.2 方法

1.2.1 基因的克隆

根据表 1 设计的引物, 以由 RNA 逆转录所得 cDNA 为模板进行 RT-PCR。

表 1 *StR2R3-MYB1* 克隆引物

Table 1 Primer sequences for *StR2R3-MYB1* cloning

基因	引物序列
<i>R2R3-MYB-PFGC594I</i>	F:5'-CCGCTCGAGATGACTTCACATGCCATGATCA-3' R:5'-CATGCCAATGGCCTTAGAAGGTTAGTGTTCGAATAGTT-3'
<i>R2R3-MYB-YFP</i>	F:5'-TCCCCCGGGATGACTTCACATGCCATGATCA-3' R:5'-CGCGGATCCATTAAGTAGATTCCATATATCATCTAGAGCAAAA-3'

表中 CTCGAG 为 *Xho* I 酶切位点; CCATGG 为 *Nco* I 酶切位点; CCCGGG 为 *Sma* I 酶切位点; GGATCC 为 *Bam* H I 酶切位点。

1.2.2 序列生物信息学分析的相关网站和软件

马铃薯基因组数据库网站: http://www.potatogenome.net/index.php/Main_Page。

蛋白结构域分析网站: <http://www.Ncbi.nlm.nih.gov/>。

转录调控区域元件分析网站: PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)。

蛋白一级结构预测网站: ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)。

卷曲螺旋结构预测网站: COILS Server (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html)。

三级结构预测网站: SWISS-MODEL (<http://>

swissmodel.expasy.org/)。

跨膜区域分析网站: TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)。

信号肽分析工具网站: SignalIP3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。

亲疏水性分析网站: <http://www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl>。

同源性分析采用 GeneDoc 软件。进化树构建采用 MEGA5.0 软件。

1.2.3 实时荧光定量 PCR

定量 PCR 反应程序: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s, 45 个循环。

内参为 *ActinB*。所有检测样品均设置 3 次重复。定量引物见表 2。

表 2 *StR2R3-MYB1* 实时荧光定量 PCR 引物

基因	引物
<i>ActinB</i>	F : 5'-AGGTCCTCTCCAGCCATCCA-3'
	R : 5'-CCACTGAGCACAATGTTACCGTAG-3'
<i>StR2R3-MYB1</i>	F : 5'-GTCACCTATTGCTGGTAGACTTCC-3'
	R : 5'-CCAATAGTTTTTCACATCGTTAGC-3'

1.2.4 拟南芥原生质体转化

取 20 μg 重组质粒,加入 100 μL 拟南芥原生质体和 110 μL PEG 溶液,混匀,放置 30 min。加入 440 μL W5 溶液,23 °C、750 r/min 离心 1 min。

1.2.5 光处理

新继代的组培苗置于黑暗、22 °C 培养箱中生长 12 d,形成白化苗。将白化苗分别置于白光、蓝光、红光、远红光培养箱中,于放置后 0、0.5、1、2、4、8、12、24 h 取样,-80 °C 保存。蓝光、红光、远红光和白光光源分别为 LED-蓝光(波长为 470 nm),LED-红光(波长为 660 nm),LED-远红光(波

长为 740 nm)和白色荧光灯。

2 结果与分析

2.1 马铃薯 *StR2R3-MYB1* 基因的克隆与同源性分析

经 RT-PCR 扩增,获得 1 条 800 bp 的特异性片段。该片段包含 1 个全长 798 bp 的 CDS 序列,编码 265 个氨基酸长度的蛋白质,命名为 *StR2R3-MYB1*。马铃薯 *StR2R3-MYB1* 蛋白序列与番茄、茄子的同源性高达 99%,与拟南芥 *MYB113* 的同源性也在 70%以上(图 1~3)。

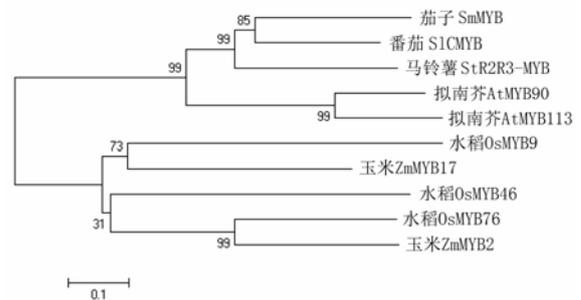


图 1 *StR2R3-MYB1* 氨基酸序列系统进化分析结果

Fig. 1 Homology analysis for amino acid sequence of *StR2R3-MYB1*

```

10      20      30      40      50      60
1  ATGACTTCACATGCCATGATCATGAGTACTCTCTATGATGTGTACATTTTGGGAGTAATA
1  M T S H A M I M S T P M M C T F L G V I
70      80      90      100     110     120
61 AGGAAAGGTTTCATGGAAGTGAAGAGATATTCCTTTGAGGAAATGTTGATAAGTAT
21 R K G S W T E E E D I L L R K C I D K Y
130     140     150     160     170     180
121 GGAGAAAGGAAAGTGGCATCTTGTTCCAACTAGAGCTGGATTAAACAGATGACAGAAAAGT
41 G E G K W H L V P T R A G L N R C R K S
190     200     210     220     230     240
181 TGTAGACTGAGGTGGCTAAATTATCTAAGGCCACATATCAAGAGAGGTGACTTTGAACCA
61 C R L R W L N Y L R P H I K R G D F E P
250     260     270     280     290     300
241 GATGAAGTGGATCTCATCTTGAGACTTCATAAGCTCTTAGCCAAACCGATGCTACTTATT
81 D E V D L I L R L H K L L G N R W S L I
310     320     330     340     350     360
301 GCTGCTAGACTTCCAGGAGGACAGCTAACGATGTCAGAAAACCTATTGCAACACTAACCTT
101 A G R L P G R T A N D V K N Y W N T N L
370     380     390     400     410     420
361 CTAAGCAAGCTAAATACTAGTACTAAATTGCTCCTCAACCAAGAAAGGAAATAACT
121 L R K L N T S T K F A P Q P Q E G I N T
430     440     450     460     470     480
421 AGTACTATGCTCTCAACCCACAAAGAGGAATTAAGTATGCGCAAGCCAAATGCCATAATA
141 S T I A P Q P Q E G I K Y G Q A N A I I
490     500     510     520     530     540
481 AGACCTCAACCTCAGAAATTCACAAGCTCCATGAAAGATTAATGTCTCTGCTGCAACCAAC
161 R P Q P Q K F T S S M K I N V S W C N N
550     560     570     580     590     600
541 AATAGTATGGTAATAATGAAAGAGCATCGAAAGCAACCAACGATATGCAATGGTGGCA
181 N S M V N N E E A S K D N N D M Q W W A
610     620     630     640     650     660
601 AATATACTGGAAACCTGCAATGACATGGAAGAGGAGAAGCTGAAAGAACACTACCTTCA
201 N I L E N C N D I G E G E A E R T L P S
670     680     690     700     710     720
661 TGTAGGAAATTAATTGCAATGAAATTTGATAAAGCAACCAAGTTTGTACATGAGGGAGGC
221 C K E I N C N E I D K A P S L L H E G G
730     740     750     760     770     780
721 AACTCCATGCAACAAGGACAAAGTGATGCTGGTTGGGATGAAATTTGCTCTAGATGATATA
241 N S M Q Q G Q G D G G W D E F A L D D I
790
781 TGGAACTCTACTTAATTAA
261 W N L L N *

```

图 2 *StR2R3-MYB1* cDNA 序列与其氨基酸序列预测结果

Fig. 2 Prediction for cDNA and amino acid sequence of *StR2R3-MYB1*

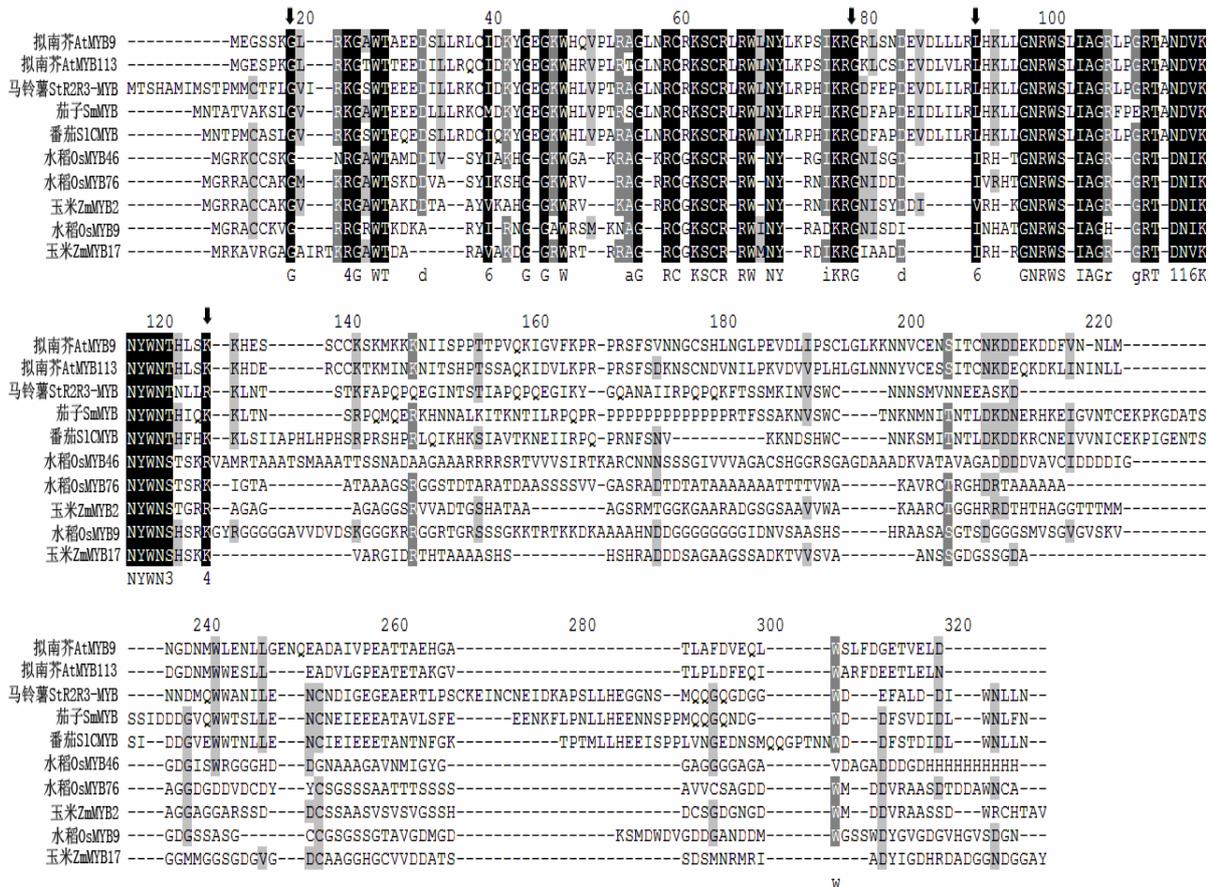


图 3 *StR2R3-MYB1* 氨基酸序列同源性分析的结果

Fig.3 Homology analysis for amino acid sequence of *StR2R3-MYB1*

2.2 *StR2R3-MYB1* 蛋白序列结构的分析

StR2R3-MYB1 蛋白全长 265 aa，主要氨基酸为天冬氨酸(9.8%)、亮氨酸(9.4%)、甘氨酸(7.5%)和谷氨酸(6.8%)，正/负电荷残基数分别为 32 和 32，相对分子质量为 30.23，分子式为 C₁₃₁₆H₂₀₇₂N₃₈₆O₃₉₉S₁₇，等电点为 6.95，不稳定系数为 47.52(>40)，稳定性弱，没有跨膜信号，蛋白氨基酸序列不存在卷曲螺旋。*StR2R3-MYB1* 蛋白的疏水区域分布比较均衡，疏水性氨基酸多于亲水性氨基酸，但其 N 端具有明显的亲水区域(图 4)。

2.3 *StR2R3-MYB1* 核酸序列的结构

StR2R3-MYB1 基因位于马铃薯 10 号染色体的 51 749 197 ~ 51 750 359 bp，基因全长 1 163 bp，由 3 个外显子和 2 个内含子构成。CDS 序列中含有 2 个 DNA-结合结构域，分别位于第 21~71 aa 和第 74~122 aa，属于 R2R3 类 MYB 转录因子，将该基因命名为 *StR2R3-MYB1*。对启动子顺式作用元件^[8]

进行分析的结果表明，*StR2R3-MYB1* 基因的调控区域存在大量与光相关的元件，如 G-Box、Box4、Box II、I-Box、MNF1 等，还存在脱落酸诱导相关元件 ABRE、生物钟相关元件 Circadian 和茉莉酸甲酯相关元件 CGTCA- motif (图 5)。

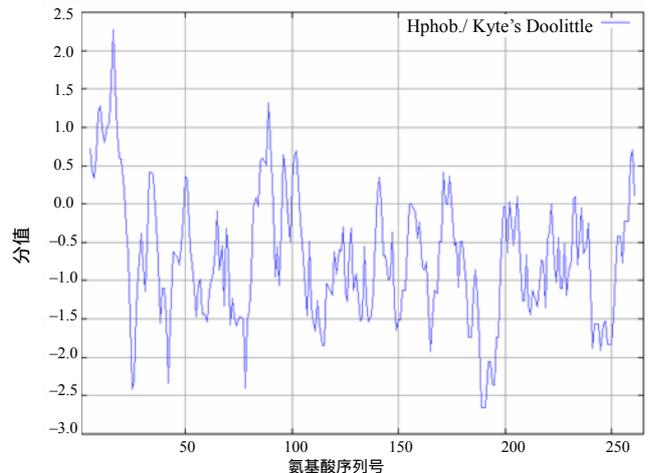


图 4 *StR2R3-MYB1* 蛋白疏水性/亲水性预测结果

Fig.4 *StR2R3-MYB1* protein hydrophobic/hydrophilic prediction

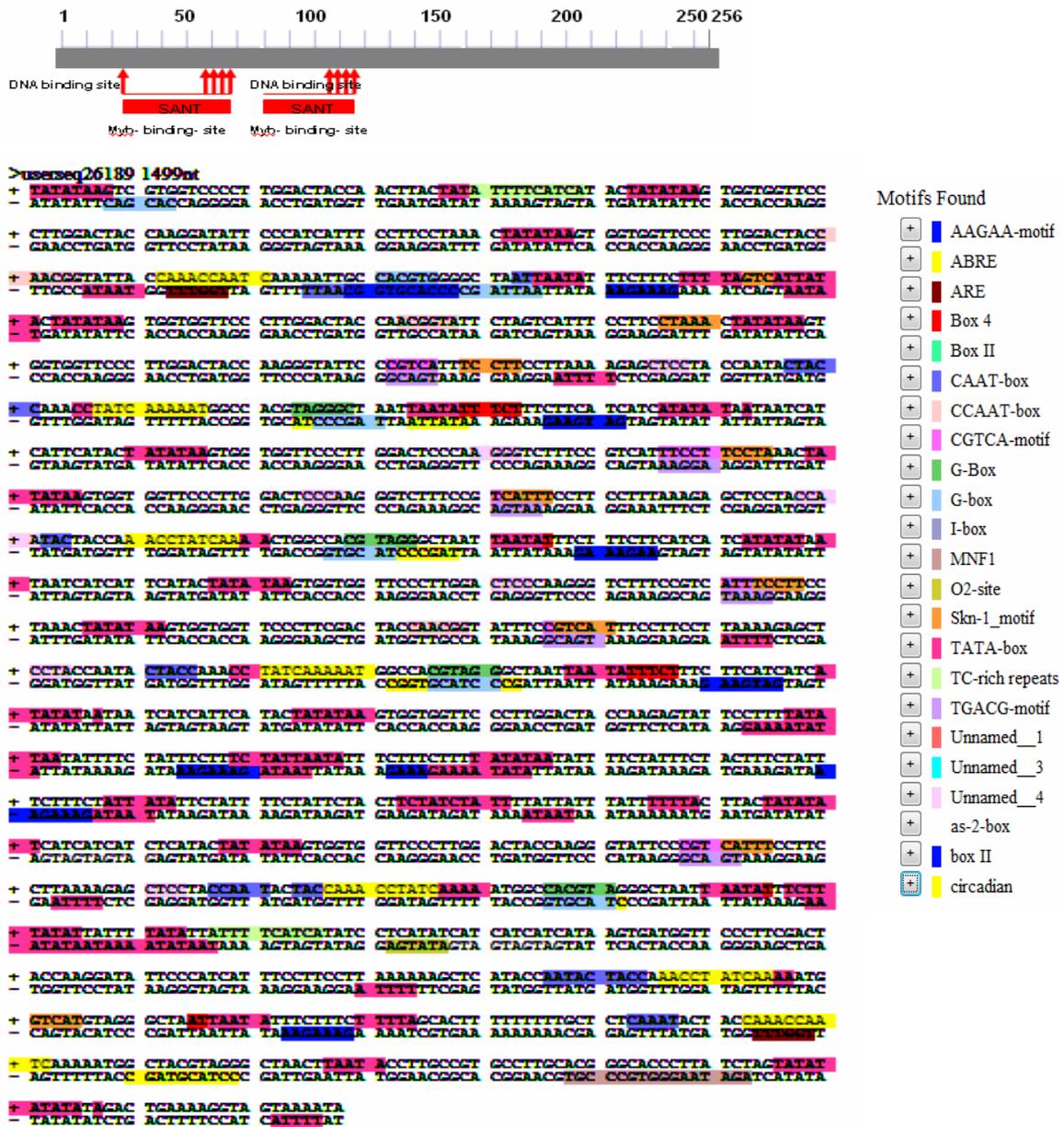
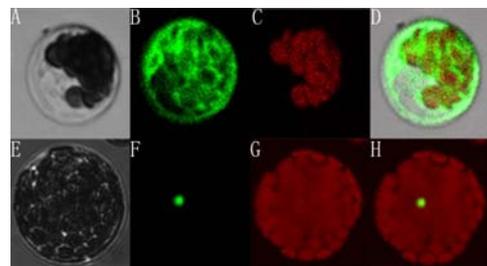


图 5 *StR2R3-MYB1* 基因结构域与转录调控区域顺式作用元件分析结果

Fig. 5 Cis-element analysis of *StR2R3-MYB1* gene and transcription regulatory region

2.4 *StR2R3-MYB1* 蛋白的亚细胞定位分析

将构建好的 *StR2R3-MYB1* 与 YFP 融合蛋白表达载体转化拟南芥原生质体，在激光共聚焦扫描显微镜下观察基因的亚细胞定位情况，可见 *StR2R3-MYB1::YFP* 融合蛋白定位在细胞核内 (图 6)。



A、B、C、D 为 *35S::YFP*；E、F、G、H 为 *StR2R3-MYB1::YFP*。YFP 荧光的激发波长为 515 nm，发射波长为 525 nm。

图 6 *StR2R3-MYB1::YFP* 融合蛋白在原生质体中的亚细胞核定位

Fig.6 *StR2R3-MYB1::YFP* Fusion protein in the nucleus position of protoplast

2.5 *StR2R3-MYB1* 基因表达模式的分析

实时荧光定量 PCR 分析结果显示, *StR2R3-MYB1* 在根、茎、叶的相对表达量依次升高(表 3)。

表 3 *StR2R3-MYB1* 基因在不同组织部位的相对表达量

组织部位	基因相对表达量
根	0.9±0.05
茎	5.3±0.18
叶	9.1±0.54

2.6 光调节 *StR2R3-MYB1* 基因的表达

黑暗培养 12 d 的马铃薯白化苗转移至白光下生长 0、0.5、2、4、8、12、24 h 的 *StR2R3-MYB1* 基因表达量随光处理时间的延长呈上升趋势(图 7), *StR2R3-MYB1* 的表达受到了白光的诱导。分别用红、蓝和远红光处理白化苗后, 3 种单色光都能诱导 *StR2R3-MYB1* 的表达, 其中远红光、蓝光诱导 4 h 时, *StR2R3-MYB1* 的表达量出现第 1 个峰值, 随后下降, 在 12 h 后回升。红光对 *StR2R3-MYB1* 的诱导作用在 8 h 后开始显现(图 7)。

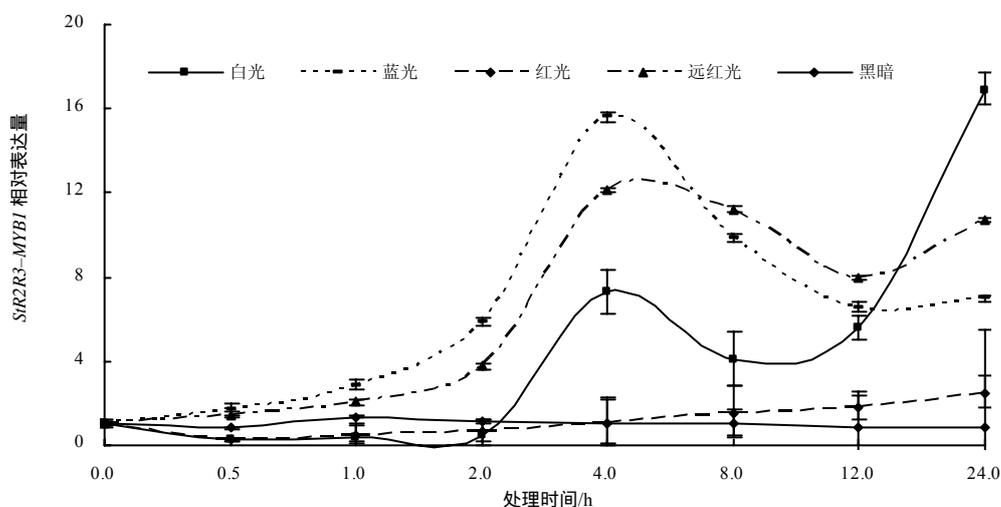


图 7 光调节 *StR2R3-MYB1* 基因的表达

Fig. 7 Expression of light regulation gene of *StR2R3-MYB1*

3 结论与讨论

在植物响应逆境胁迫的信号传导系统中, 转录因子起着重要的作用。序列分析结果表明, 马铃薯 *StR2R3-MYB1* 与其他 MYB 家族转录因子在 DNA 结合域具有高度保守性, 属于典型的 R2R3 类型 MYB 转录因子。核苷酸序列和氨基酸序列分析结果表明, *StR2R3-MYB1* 的调控区域存在大量与光相关的元件, 如 G-Box、Box4、Box II、I-Box、MNF1 等, 还存在脱落酸诱导相关元件 ABRE、生物钟相关元件 Circadian、茉莉酸甲酯相关元件 CGTCA。 *StR2R3-MYB1* 的转录很可能受光信号及环境胁迫的诱导。 *StR2R3-MYB1* 氨基酸序列上没有跨膜信号, 不存在卷曲螺旋, 具有明显的亲水区域, 氨基酸残基与水分子的相互作用较强, 表明该蛋白的稳定性较低。亚细胞定位分析发现 *StR2R3-MYB1* 蛋白在细胞核中表达, 这正符合转录因子的亚细胞定位特征。系统进化分析结果表明, *StR2R3-MYB1* 与拟南

芥 AtMTB113、AtMTB90 和茄子 SmMYB 及番茄 SlCMTYB1 同属于 1 个亚族。该亚族 MYB 转录因子的功能多数与花青素合成相关, 如 AtMTB113 与花青素积累有关^[8-9], 而 AtMTB90 与色素合成相关^[10], SmMYB 与花青素合成相关^[11], SlCMTYB1 则与冷诱导、低温胁迫相关^[12]。笔者的前期研究^[7]中运用多因子及其互作逐步回归法建立光照度、温度和处理时间影响基因表达的模式, 发现环境温度与 *StR2R3-MYB1* 和 *StPAL*、*StDFR* 基因的表达量呈负相关, 环境光照度与 *StR2R3-MYB1* 和 *StCHS*、*StDFR* 的表达呈正相关。马铃薯 *StR2R3-MYB1* 转录调节因子对 *StCHS* 基因的表达具有明显正向影响。本研究中 *StR2R3-MYB1* 蛋白结构分析、蛋白功能预测、基因组织表达特性分析及光处理后基因表达特性分析等研究结果, 使前期研究中的推断 *StR2R3-MYB1* 与受光和低温调节的马铃薯花青素合成相关^[7]得到了进一步的印证。

参考文献:

- [1] Thompson M A ,Ramsay R G .Myb :An old onco protein with new roles[J] . Bioessays , 1995 : 17(4) : 341–350 .
- [2] Ogata K ,Hojo H ,Aimoto S ,et al .Solution structure of a DNA-binding unit of Myb : A helix-turn-helix-related motif with conserved tryptophans forming a hydrophobic core[J] . Proc Natl Acad Sci USA , 1992 , 89(14) : 6428–6432 .
- [3] Paz-Ares J ,Ghosal D ,Wienand U ,et al .The regulatory c1 locus of zea mays encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators[J] . EMBO J , 1987 , 6(12) : 3553–3558 .
- [4] Rabinowicz P D , Braun E L , Wolfe A D , et al . Maize *R2R3-Myb* genes : Sequence analysis reveals amplification in the higher plants[J] . Genetics , 1999 , 153(1) : 427–444 .
- [5] Yanhui C , Xiaoyuan Y , Kun H , et al . The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis* : Expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family[J] . Plant Mol Biol , 2006 , 60(1) : 107–124 .
- [6] Knight H ,Trewavas A J ,Knight M R .Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity[J] . Plant J , 1997 , 12(5) : 1067–1078 .
- [7] Qin Y Z ,Tai G ,Xie K Y ,et al . Ambient light alters gene expression pattern of enzymes and transcription factor involved in phenylpropanoid metabolic pathway in potato under chilling stress[J] . Agricultural Science & Technology , 2014 , 15(11) : 1899–1904 .
- [8] Schwob E ,Bohm T ,Mendenhall M D ,et al .The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S .cerevisiae* [J] .Cell,1994 ,79(2) :233–244 .
- [9] Luo Q J , Mittal A , Jia F , et al . An autoregulatory feedback loop involving PAP1 and TAS4 in response to sugars in *Arabidopsis*[J] . Plant Mol Biol , 2012 , 80(1) : 117–129 .
- [10] Velten J , Cakir C , Cazzonelli C I . A spontaneous dominant-negative mutation within a 35S : AtMYB90 transgene inhibits flower pigment production in tobacco[J] . PLoS One , 2010 , 5(3) : e9917 .
- [11] 邵文婷,刘杨,韩洪强,等.茄子花青素合成相关基因 *SmMYB* 的克隆与表达分析[J].园艺学报,2013,40(3):467–478.
- [12] 张欣,程治军,林启冰,等.番茄冷诱导基因*SICMYB1*的克隆及其在水稻中异源表达研究[J].作物学报,2011(4):587–594.

责任编辑:王赛群

英文编辑:王 库